

二国間交流事業 共同研究報告書

令和6年4月19日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
帯広畜産大学・原虫病研究センター
[職・氏名]
教授・横山直明
[課題番号]
JPJSBP 120229903

1. 事業名 相手国: スリランカ (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 新牛タイレリア (*Theileria* sp. Yokoyama) の分離及び性状解析(英文) Isolation and characterization of *Theileria* sp. Yokoyama from cattle in Sri Lanka3. 共同研究実施期間 2022年4月1日 ~ 2024年3月31日 (2年0ヶ月)【延長前】 年 月 日 ~ 年 月 日 (年 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Veterinary Research Institute・Director・Kothalawala Hemal

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,269,556 円
内訳	1年度目執行経費	1,900,000 円
	2年度目執行経費	1,369,556 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	5名
相手国側参加者等	5名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	1	0	()
2年度目	2	0	()
3年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

<研究交流の目的>

我々がスリランカで発見した新牛タイレリア(暫定名称: *Theileria* sp. Yokoyama)の野生株を、流行国であるスリランカ牛の血液から分離・培養し、その感染原虫を多角的に解析することで、病原性解明や診断・予防・治療の開発に繋がる“生物学的並びに遺伝学的な基礎的知見”を共同で収集する。また、新牛タイレリアに対する遺伝子診断法(PCR 法)を整備し、スリランカ全土の疫学調査を実施することで、最新の新牛タイレリア病の発生状況、臨床症状の特徴、現場の対処方法等に関する基礎データを収集する。

<研究交流の実施状況>

2022 年度

2023 年 3 月:横山がスリランカ獣医学研究所を訪問し、Kothalawala 所長とこれまでの研究成果と今後の研究計画について意見交換を行った。また、必要な技術や研究試料を相手国参加者に移転した。さらに、「スリランカにおける牛・馬ピロプラズマ病(タイレリア病とバベシア病の総称)の発生と対策」に関する国際獣疫事務局(WOAH)学術交流セミナーをスリランカ獣医学研究所内で開催した(10 人のスリランカ研究者が参加した)。また現地調査も開始し、新牛タイレリアの分離に向けてスリランカ牛の血液サンプルを日本に搬入した。

2023 年度

2024 年 11 月:スリランカ獣医学研究所の研究員(所長を含む 3 名)を交えて、「新牛タイレリア(*Theileria* sp. Yokoyama)の国際疫学と臨床学的重要性」に関する WOAH 学術交流セミナーをオンラインで開催した(計 10 名が参加した)。また、相手国参加者から研究の進捗報告を受け、議論を行なった。

2024 年 3 月:横山と Sivakumar 博士がスリランカ獣医学研究所を訪問し、Kothalawala 所長に、これまでの研究成果について報告し、また今後に向けた交流事業について意見交換を行った。また、「牛・馬ピロプラズマ病の簡易診断法」に関する WOAH 技術トレーニング研修会をペラデニア大学・獣医学部内で開催した(獣医学部生を含め 5 人が参加した)。また現地調査も実施し、新牛タイレリアの分離に向けてスリランカ牛の血液サンプルを日本に搬入した。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

1)スリランカ国内の新牛タイレリア(*Theileria* sp. Yokoyama)の疫学と臨床学的重要性

新牛タイレリアに特異的な遺伝子診断法を開発・整備し、2023 年 2 月から 9 月の間にスリランカ国内で飼育されている牛計 206 頭から採取された血液 DNA サンプルを用いて、その遺伝子診断を行なった。その結果、60 頭(29.1%)のスリランカ牛が新牛タイレリアに感染している実態が判明した。その感染は、在来種(*Bos indicus*)よりも外来種(*Bos taurus*)が、舎飼牛よりも放牧牛が、またマダニ寄生歴がある牛が、その感染リスクが有意に高いことが明らかになった。さらに、新牛タイレリア感染牛は、非感染牛と比較して、有意に低い異常な

血液指標 (Hb、HCT、RBC) を示すことが明らかとなった。すなわち、新牛タイレリア感染牛は深刻な貧血を呈していた。これら現地調査の研究成果は、スリランカ獣医学研究所と共同で現在論文投稿に向けて準備を進めている。

2) 新牛タイレリアの分離培養について

2023 年 3 月と 2024 年 3 月に新牛タイレリアの感染を疑う牛から血液を採取し、農林水産省・動物検疫所から輸入許可証を取得したのち、日本に搬入した。1 回目の試みではその保存法と輸送法の改善が必要となったが、2 回目では順調に感染血液を国内に搬送し、現在原虫病研究センターにて分離・培養を継続している。そのため、新牛タイレリアの解析にはまだ至っていない。

3) 本二国間交流事業を通じて、以下の学術的成果を得ることができた。すべて、国際学術論文に掲載されている。

<2022 年の学術的成果>

1. スリランカのロバにおける馬ピロプラズマ (*Theileria equi* と *Babesia caballi*) の感染状況を調査するため、スリランカの2県で放し飼いの計 111 頭のロバから無作為に血液サンプルを採取し、種特異的 PCR 法を用いて両原虫種のスクリーニング診断を行った。その結果、95 頭 (85.6%) のロバが *T. equi* 陽性を示した。しかし、*B. caballi* は全例陰性であった。*T. equi* の遺伝学的系統樹解析から、2 つの異なる遺伝子型 (C と D) が検出された。これはスリランカにおける *T. equi* の最初の報告であり、ロバにおける遺伝子型 C の初めての報告となった。本研究から、*T. equi* 感染のために減少しているスリランカのロバの今後のモニタリングの重要性が示された。
2. エジプトのラクダを対象に、バベシア、タイレリア、トリパノソーマ、アナプラズマによる感染症学調査を行った。すなわち、エジプト 6 県で飼育されているラクダ計 148 頭の血液 DNA サンプルを、種特異的 PCR 法を用いてスクリーニング診断を行った。その結果、29 頭 (19.6%)、22 頭 (14.9%)、1 頭 (0.7%)、2 頭 (1.4%)、1 頭 (0.7%)、2 頭 (1.4%)、及び 28 頭 (18.9%) が、それぞれ *Babesia bovis*、*B. bigemina*、*Babesia* sp. Mymensingh、*Theileria* sp. Yokoyama、*Theileria equi*、*Trypanosoma evansi*、及び *Anaplasma marginale* に感染していた。本研究は、エジプトで初めて *Theileria* sp. Yokoyama と *Babesia* sp. Mymensingh の感染例を報告したものとなった。また、ラクダにおけるこれら 2 種の感染の報告も初めとなった。
3. スリランカで発見された新たな高病原性牛バベシア原虫 (*Babesia* sp. Mymensingh) は、世界に広く分布していることがわかってきた。本研究では *Babesia* sp. Mymensingh のミトコンドリア遺伝子、プラスチド遺伝子、及び核遺伝子の塩基配列を決定し、*Babesia* sp. Mymensingh の系統学的位置づけをより詳細に解析した。その結果、*Babesia* sp. Mymensingh は極めてユニークな種であることが確認され、新たな学術名称 (*Babesia naoakii*) を命名した。

<2023 年の学術的成果>

4. スリランカの疫学研究で確立した馬ピロプラズマ原虫 (*Theileria equi* と *Babesia caballi*) を検出できる種特異的 PCR 法を用いて、パラグアイの 16 県で飼育されている計 545 頭の馬から調整された血液 DNA サ

ンプルのスクリーニング診断を行った。その結果、178 頭(32.7%)が *T. equi* に、また 8 頭(1.5%)が *B. caballi* に、それぞれ感染している実態が明らかとなった。またパラグアイの陽性サンプルから、遺伝子型 A と C の *T. equi* が検出された。本研究によりパラグアイの馬は *T. equi* と *B. caballi* に感染しており、*T. equi* の感染率は *B. caballi* の感染率よりも高いことが示された。

5. キルギスで飼育されていた牛 319 頭の血液 DNA サンプルから、バベシア、タイレリア、トリパノソーマ、及びアナプラズマ感染を検出できる種特異的 PCR 法でスクリーニング診断を行った。その結果、最も多かったのは *Theileria orientalis*(84.3%) で、次いで *Babesia bigemina*(47.6%)、*Theileria annulata*(16.6%)、*Anaplasma marginale*(11.6%)、*Trypanosoma theileri*(7.2%)、*Babesia bovis*(2.5%) が検出された。追加スクリーニング調査を行ったところ、*Babesia major* と *Babesia occultans* の感染も確認された。新牛タイレリア (*Theileria* sp. Yokoyama) は検出されなかった。これはキルギスの牛における *B. bovis*、*B. bigemina*、*B. occultans*、*Try. theileri*、及び *A. marginale* 感染の最初の報告となった。
6. 18S rRNA 配列に基づき *Theileria equi* は 5 つの遺伝子型に分類されるが、これらの遺伝子型は疾病の管理および制御にとって重要となる。本研究では、それぞれの遺伝子型を検出できる特異的 PCR 法の開発を試みた。各遺伝子型特異的 PCR 法は、目的とする遺伝子型を正確に、かつ特異的に増幅でき、その特異性が実証された。次に、*T. equi* 陽性の 270 頭(スリランカのロバ 92 頭とパラグアイの馬 178 頭)の血液 DNA サンプルを用いて、本 PCR 法の有用性を評価した。その結果、我々の PCR 法は、スリランカ検体から 4 つの遺伝子型(A、C、D、E)を、パラグアイ検体からは 5 つの遺伝子型すべてを検出し、非常に高い感度を示した。また、スリランカとパラグアイの検体のそれぞれ 90.2%と 22.5%で、複数の遺伝子型がさまざまな組み合わせで検出され、共感染をも検出する能力も持っていた。さらに、PCR アンプリコンの塩基配列は各遺伝子型の系統学的クレードに集約され、本遺伝子型特異的 PCR 法の特異性が実証された。本研究で開発された PCR 法は、*T. equi* の遺伝子型を区別して検出できる有用性の高い診断法であることが証明された。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

本二国間交流事業では、スリランカ獣医学研究所に所属する若手研究員が主体的となって、現地で牛や馬の材料採取を行い、形態学的診断、遺伝子診断、血液診断などの一連の疫学解析を行った。スリランカに渡航した際は、現地で研究進捗発表会や学術交流セミナーを開催し、二国間の学術交流を行なった。それ以外にもオンラインによる意見交換や学術交流セミナーを開催している。特に、新牛タイレリア (*Theileria* sp. Yokoyama) の疫学と臨床学的重要性に加えて、馬ピロプラズマや牛バベシアの新たな疫学的知見も得ることができた。さらに、これらの学術交流を通じて、将来博士課程の取得を希望している 2 人の若手研究員とも出会うことができた。2024 年度から帯広畜産大学で論文博士を取得できるよう、彼らに対する研究指導を開始している。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

新牛タイレリアの存在は、これまでの共同研究の成果として 2019 年に公知となった。スリランカ国では新牛タイレリアの感染によると見られるリンパ節腫脹を見る牛の臨床例が多発していることから、今後世界のタイレリア病の研究者らが、本新牛タイレリアに注目し調査を開始するものと考えられる。当該研究は、1)新牛タイレリアを発見した当事者が、2)どこよりも早く新牛タイレリア病に関する学術基盤を整備し、3)発見したそのスリランカ

国をモデルに、新牛タイレリアのリスク因子を独占的に明らかにし、4) 新タイレリア病対応策ガイドラインを構築することで、世界を強力に牽引していく野心的な基盤研究課題である。その点において、我々は大きく前進したものとなった。

スリランカ動物生産・健康局管轄の獣医学研究所は、スリランカ国全体の疫学情報を集約し、それぞれの疾病に対して対応策ガイドラインを策定して、各地方の獣医行政オフィスを指導していく立場にある。新牛タイレリアの発見の際は、スリランカ動物生産・健康局内で慎重に議論した結果、自国の感染症対策の利益と世界の防疫体制強化に向けて公開する決断を下している。閉鎖的な国々が多い中、スリランカ国の対応は大いに評価されるべきである。ゆえに、スリランカ国で発見された新牛タイレリアの学術基盤の構築は、スリランカ動物生産・健康局にとって囑望された最重要課題と言える。本学術共同研究を遂行する中で、スリランカ獣医学研究所の研究員は、今後独自で展開する上で必要となる牛・馬ピロプラズマ病の国内調査法、サンプリング法、解析法、論文作成に関わる技術やノウハウを習得できたと考える。WOAH 専門家として、スリランカ国に大きく貢献できたと考える。

(5) 若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

横山は“牛と馬のピロプラズマ病(タイレリア病とバベシア病の総称)”のWOAH リファレンスラボラトリー認定専門家であり、常にピロプラズマ病の国際分布、診断、治療、及び予防に関する最新情報を世界に発信し、かつ世界で実用している本疾病の“WOAH 診断・予防マニュアル”や“WOAH 家畜動物衛生基準”を更新していく立場にある。また、原虫病研究センターは、“動物原虫病のサーベイランスと防疫”に関する国際施設として、WOAH コラボレイティングセンターにも認定されている。すなわち、原虫病研究センターはWOAH の活動を通して、世界に蔓延する家畜原虫病対策に大きく貢献してきた。日本側参加者の白藤梨可准教授、麻田正仁准教授、Sivakumar 機関研究員は将来この WOAH 業務の中核を継承していく若手研究者である。本共同研究事業の参画を通して、未来の WOAH 専門家養成に貢献できた。

(6) 将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本共同研究の成果は、スリランカ国と日本との間の2国間共同研究にとどまらず、スリランカモデルとして世界の国際防疫体制強化に資するものである。得られた成果は、WOAH 診断・予防マニュアルや WOAH 家畜動物衛生基準にも反映され、世界規模で連携が求められる国際規模解決課題として、その強化事業を今後も確立・牽引していく。

(7) その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例: 大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

2024 年度 二国間交流事業 オープンパートナーシップ共同研究「スリランカのロバに感染する馬ピロプラズマの性状解析並びに馬への感染リスク評価」に採択され、スリランカとの二国間交流は 2024 年度以降も継続する。